

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640088

研究課題名(和文) 脳腫瘍の発生に関わる新規分子の同定とその分子基盤を標的とした化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of a novel tumor-associated protein in gliomagenesis and chemicals targeting its function.

研究代表者

近藤 豊 (Kondo, Yutaka)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00419897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでGBM発生マウスモデルを用いた解析から共通して増幅する遺伝子領域を見出した。本研究では、解析マウスを増やして発がんに関わる責任遺伝子の同定を行うと共に、それらの遺伝子の機能解析および作用を阻害する小分子化合物についての解析を行った。本マウスモデルではHMT-1が腫瘍発生過程の早期より過剰発現するが、増幅遺伝子領域中にはHMT-1と結合する別のタンパク質HMT-2が存在することを見出した。HMT-1、HMT-2の阻害は、*in vitro*、*in vivo*で効果的にGBMの増殖を抑制することから、本研究の成果を発展させることで、今後新たなGBM治療薬の開発が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：In the current project, using mouse model (Tp53 and Nf1 loss), which spontaneously develops proneural GBM, we found that a certain specific gene locus is commonly (100%) amplified in multiple mice (n=5). In addition, although HMT-1 is not located in the amplified locus, it was overexpressed from early stage of gliomagenesis in this model. Intriguingly, among the genes located in commonly amplified locus, we identified HMT-2, which forms aberrant complex with HMT-1 in the tumor cells. Inhibition of HMT-1 and/or HMT-2 by a small molecules or siRNA system efficiently suppressed the tumor growth both *in vitro* and *in vivo*. Our data indicate that targeting these molecules (HMT-1 and HMT-2) may be a novel and potent therapeutic strategy for GBMs, especially proneural subtype.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：グリオブラストーマ エピジェネティクス 治療

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマ (GBM) は極めて悪性度が高く、現在の集学的治療を用いても根治は困難である。我々はこれまでヒト GBM 臨床検体および GBM 発生マウスモデルを用いて研究を展開してきた。我々の保持するマウスモデルは、神経幹細胞特異的に p53 と Nf1 遺伝子が両アレル欠失し脳腫瘍を発生する。p53 および Nf1 の不活化変異は、一部の GBM でしばしば見られる遺伝子変異であり、本マウスモデルの脳腫瘍もヒトの proneural GBM と近似した組織像、遺伝子発現様式を呈する。これまでに本マウスモデルを用いてゲノム・エピゲノム異常を解析した結果、解析したすべてのマウス GBM で共通して増幅する遺伝子領域を見出した。さらに複数のマウスを解析した結果、増幅領域に存在し高発現する遺伝子を 17 遺伝子まで絞り込んだ。本研究では、解析マウスを増やして発がんに関わる責任遺伝子の同定を行うと共に、それらの遺伝子の機能解析および作用を阻害する小分子化合物のスクリーニング系の構築までを目指す。

我々がマウスモデルの解析から増幅を見出した領域は、これまでヒトの GBM と隣がんでも増幅が報告されているが、その発がんへの分子生物学的意義は国内外で全く研究が行われていない。すなわち本研究は GBM の新規治療薬を開発する上で新規性が極めて高く、今まさに行うべき喫緊の研究課題であると考えられる。

2. 研究の目的

GBM は原発性脳腫瘍のうち高頻度にみられる極めて悪性度の高い腫瘍であり、有効な治療法の開発が喫緊の課題である。有効ながん治療を目指すためには、がん細胞に特異的な弱点を見つけその分子基盤を標的とした分子標的薬の開発が必要である。本研究では GBM 発生マウスモデルとヒト GBM のゲノム・エピゲノム解析から、我々が新規発見した高頻度遺伝子増幅領域に着目し、その領域に存在する発がんの責任遺伝子の解明とその分子基盤を標的とした治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、GBM の発生に関わる新規がん関連遺伝子の同定およびその機能解析、さらに同定した発がん分子機構を標的とする小分子化合物の同定を試みる。

1) 増幅領域の発がんに関わる責任遺伝子の同定。

これまでに解析してきた GBM 発生マウスを用いて遺伝子増幅領域に存在する発がんに関わる責任遺伝子を同定する。公共データベース The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いて GBM 臨床例で増幅および高発現している遺伝子の絞り込みを行う。また私たち

の保有する臨床検体を用いて、データベースから得られた発現様式の検証を行う。

2) 同定した発がん関連遺伝子の機能解析。

絞り込んだ遺伝子に対する siRNA による抗腫瘍効果から責任遺伝子を同定する。マウス GBM 細胞を用いて同定した遺伝子の機能解析および発がんへの寄与を解析する。

3) 同定した発がん関連遺伝子を標的とした小分子化合物のスクリーニング系の構築。

同定した機能を阻害する化合物についてアッセイ系を構築し、GBM に対する抗腫瘍効果を持つ化合物の同定を目指す。

4. 研究成果

我々が解析に用いた GBM 発生マウスモデルの遺伝子発現解析結果から、本マウスモデルは proneural type で DNA メチル化の高集積のない GBM に分類されることがわかった。さらに新たにヒストンメチル化酵素 (HMT-1) が腫瘍発生過程の早期より過剰発現していることも見出した。同酵素は高頻度に増幅している遺伝子領域には含まれていない。

1) 増幅領域の発がんに関わる責任遺伝子の同定。

マウス GBM で増幅する遺伝子領域 17 遺伝子につき TCGA のデータを用いて解析した。ヒト GBM 臨床検体で遺伝子増幅、発現上昇する遺伝子を選択した。その結果 7 遺伝子まで絞り込んだ。

2) 同定した発がん関連遺伝子の機能解析。

マウス GBM から樹立した細胞株を用いて、siRNA により、絞り込みを行った遺伝子のノックダウンを行った。効果的に細胞増殖を抑制する 3 遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、エピゲノム修飾タンパク質 (HMT-2)、Notch シグナル関連タンパク質、転写複合体構成因子をコードする遺伝子であった。このうち HMT-2 は発生初期の幹細胞で特異的に発現することがこれまで見出されている。興味深いことに、がんの発現早期から発現上昇が観察された HMT-1 と HMT-2 は結合していることを見出した。本結合は正常神経幹細胞や神経細胞には観察されず、脳腫瘍特異的な結合であると考えた。

3) 同定した発がん関連遺伝子を標的とした小分子化合物のスクリーニング系の構築。

HMT-1 の KO マウスを GBM 発生マウスと交配し、HMT-1 の片アレル欠失 GBM 発生マウス (p53, Nf1^{-/-}; HMT-1^{-/+}) を作製した。同マウスは GBM 発生マウスと比較して GBM 形成能が低いことを見出した。そこで HMT-1 の阻害剤を GBM 発生マウスに投与し、腫瘍形成への影響を観察したところ、明らかな抗腫瘍効果が見られた。

また HMT-1 と複合体を形成し、GBM 発生マウスモデルで高度な遺伝子増幅と発現上昇をする HMT-2 は、腫瘍発生時のエピゲノ

ム異常に寄与している可能性が高いと考える。実際 HMT-2 を siRNA で阻害すると GBM 細胞の増殖抑制が観察されたことから、現在製薬企業との共同研究で HMT-2 の特異的阻害剤の開発を開始した。

【考察】

本研究では GBM 発生マウスモデルで遺伝子増幅する領域を解析し 3 遺伝子を同定した。そのうち HMT-2 は、発がん過程の早期から発現が上昇するエピゲノム修飾酵素 HMT-1 と複合体形成をすることを見出した。HMT-1 の阻害剤は既に同定されていることから今後 GBM の治療薬として臨床応用される可能性が期待できる。一方、HMT-2 は一般に胚性幹細胞のみで発現が観察され、脳組織ではほとんど発現がみられない。また HMT-1 と HMT-2 の複合体形成は GBM 特異的であることから、HMT-2 は抗腫瘍薬の標的として有効である可能性が高い。本研究の推進により、新たな GBM 治療薬の開発が期待できると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Shinjo K, Kondo Y, Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine, *Adv Drug Deliv Rev*, 査読有、Vol.95, 2015, pp.56 - 64, DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.006

Fujii S, Srivastava V, Hegde A, Kondo Y, Shen L, Hoshino K, Gonzalez Y, Wang J, Sasai K, Ma X, Katayama H, Estecio MR, Hamilton SR, Wistuba I, Issa JP, Sen S, Regulation of AURKC expression by CpG island methylation in human cancer cells, *Tumour Biol*, 査読有、Vol.36, 2015, pp.8147 - 58, DOI: 10.1007/s13277-015-3553-5

Suzuki H, Aoki K, Kondo Y, Natsume A, Ogawa S, Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas, *Nat Genet*, 査読有、Vol.47, 2015, pp.458 - 68, DOI: 10.1038/ng.3273

Ichimura N, Shinjo K, An B, Shimizu Y, Yamao K, Ohka F, Katsushima K, Hatanaka A, Tojo M, Yamamoto E, Suzuki H, Ueda M, Kondo Y, Aberrant TET1 Methylation Closely Associated with CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer, *Cancer Prev Res*, 査読有、Vol.8, 2015, pp.702 - 11, DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0306

Ishikawa K, Tsunekawa S, Ikeniwa M, Izumoto T, Iida A, Ogata H, Uenishi E, Seino Y, Ozaki N, Sugimura Y, Hamada Y, Kuroda A, Shinjo K, Kondo Y, Oiso Y, Long-Term Pancreatic Beta Cell Exposure to High Levels of Glucose but Not Palmitate Induces DNA Methylation within the Insulin Gene Promoter and Represses Transcriptional Activity, *PLoS One*, 査読有、Vol.10, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0115350

Gao W, Gu Y, Li Z, Cai H, Peng Q, Tu M, Kondo Y, Shinjo K, Zhu Y, Zhang J, Sekido Y, Han B, Qian Z, Miao Y, miR-615-5p is epigenetically inactivated and functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Oncogene*, 査読有、Vol.34, 2015, pp.1629 - 40 DOI: 10.1038/onc.2014.101

〔学会発表〕(計 14 件)

近藤 豊、がんのエピゲノム研究から新しい治療法の開発へ、第 13 回日本免疫治療学会学術集会、2016 年 2 月 27 日、「東京ガーデンパレス(東京都・文京区)」

近藤 豊、Clinical implications of epigenetic alterations in human tumors, The 20th Japanese Foundation for Cancer Research、2015 年 12 月 10 日、「日本科学未来館(東京都・江東区)」

近藤 豊、がんのエピゲノム解読による新たながん治療開発、第 53 回日本癌治療学会学術集会、2015 年 10 月 29 日、「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

近藤 豊、グリオーマの発がんに関わるエピゲノム異常、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

近藤 豊、Interaction between Microenvironment and Epigenome in Gliomagenesis, The 40th Naito Conference on Epigenetics - From Histone Code to Therapeutic Strategy、2015 年 9 月 17 日、「シャトレーゼガトーキングダムサッポロ(北海道・札幌市)」

近藤 豊、TUG1, a Notch-regulated Non-coding RNA Maintains Stemness in Gliomas, The 10th Asian Epigenomics Meeting、2015 年 9 月 9 日、「Seoul(Korea)」

近藤 豊、Interaction between Microenvironment and Epigenetics in

Glioma, The 34th Sapporo International Cancer Symposium, 2015年6月26日、「ロイトン札幌ホテル(北海道・札幌市)」

近藤 豊、がんエピゲノム異常を標的とした治療・診断法の開発、第3回国際先端生物学・医学・工学会議、2015年1月16日、「名古屋大学豊田講堂シンポジオン(愛知県・名古屋市)」

近藤 豊、A Study of novel DNA methylation biomarkers and assays to detect circulating tumor DNA, The 19th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2014年11月29日、「Jeju (Korea)」

近藤 豊、細胞外環境による脳腫瘍幹細胞のエピジェネティック制御、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

近藤 豊、Long Non-coding RNA Regulation of the Epigenome in Glioblastoma, Epigenetics in Development & Diseases 9th Asian Epigenomics Meeting, 2014年8月25日、「Biopolis (Singapore)」

近藤 豊、エピジェネティクスによるがん細胞の動的・特異的制御、第2回 Aging, Bone and Cancer Frontline Forum, 2014年5月8日、「山の上ホテル(東京都・千代田区)」

近藤 豊、Glioma Stem Cells Maintained by Notch-Epigenetic Pathway, 2014 SNUCRI Cancer Symposium, 2014年4月17日、「Mokpo (Korea)」

近藤 豊、New technology to detect DNA methylation in plasma sample from lung cancer patients, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014, 2014年4月7日、「San Diego(USA)」

〔図書〕(計9件)

近藤 豊 他、Academic Press, Clinical Significance of Epigenetic Alterations in Glioblastoma, 2015, 12 (pp.339 - 50)

近藤 豊 他、株式会社メディカルレビュー社、Frontiers in Gastroenterology, 2015, 8 (pp.45 - 52)

近藤 豊 他、株式会社羊土社、実験医学 特集 原因か?結果か?がんのエピゲノム異常 環境因子による発がんメカニズムの理解からエピゲノム創薬へ、2014, 7 (pp.3054 - 60)

Kondo Y, OXFORD JOURNALS, THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2014, 9 (pp.249 - 57)

近藤 豊 他、株式会社医学書院、脳神経外科、2014, 9 (pp.701 - 9)

近藤 豊 他、株式会社羊土社、実験医学増刊 個別化医療を拓くがんゲノム研究 解き明かされるがんの本質と分子診断・治療応用への展開、2014, 7 (pp.144 - 50)

近藤 豊 他、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ がんゲノム研究の進歩 - 網羅的解析からの知見、2014, 6 (pp.1067 - 72)

近藤 豊 他、株式会社シーエムシー出版、エピジェネティクスの産業応用、2014, 9 (pp.173 - 81)

近藤 豊 他、The official journal of the Japanese Cancer Association, Cancer Science, 2014, 7 (pp.363 - 9)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 抗腫瘍性ドラッグデリバリー製剤
発明者: 近藤 豊、勝島啓佑、片岡一則、宮田完二郎、キム ヒョンジン
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許願 2015-226895号
出願年月日: 平成27年11月19日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 豊 (KONDO, Yutaka)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00419897

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

新城 恵子 (SHINJO, Keiko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40641618

夏目 敦至 (NATSUME, Atsushi)
名古屋大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30362255

鈴木 孝禎 (SUZUKI, Takayoshi)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90372838